饲料中狐狸、水貂、貉子和狗源性的五重实时荧光 PCR 检测方法的建立

刘艳艳[1],李会荣[2]，胡悦[1]，范阳阳[1]，李祥明[2]，谭晴晴[1]，吴家强[3]，步迅[1*]

(1.山东省农业科学院生物技术研究中心 2. 山东省饲料质量检验所 3. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所)

摘要：为了快速鉴别饲料中的狐狸、水貂、貉子和狗源性成分，根据线粒体 16S rDNA 种间保守序列，设计合成针对狐狸、水貂、貉子和狗的特异性引物和探针，通过对荧光 PCR 反应体系和反应条件的优化筛选，建立了多重实时荧光 PCR 方法，在同一 PCR 反应体系中可以同时完成 4 种动物源性成分检测。通过对 15 种其他物种的源性成分的检测，结果表明本试验设计的引物和探针具有很好的物种特异性，且灵敏度高，狐狸、水貂、貉子和狗的 DNA 检出限为 0.01ng。对 40 份样品检测，其中 5 份检测出貉子、狐狸和水貂源性成分。结果表明，该方法可以有效的鉴别出饲料中狐狸、水貂、貉子和狗源性成分，同时适用于相关动物产品中。

关键词：线粒体 16S rDNA；多重实时荧光 PCR；狐狸、水貂、貉子和狗动物源性成分

Multiplex fluorescent real-time PCR detection of fox, mink, raccoon and dog derived materials in feedstuff

LIU Yan-yan[1]，LI Hui-rong[2],HU Yue[1],FAN Yang-yang[1],LI Xiang-ming[2],TAN Qing-qing[1],WU Jia-qiang[3],BU Xun[1*]

(1 Biotechnology research center Shandong academy of agricultural sciences ,2 Shandong feed quality inspection,3 Iinstitute of animal husbandry and veterinary Shandong academy of agricultural sciences)

1

Abstract: In order to identify the fox, mink, raccoon and dog-derived components in feed, the specific primers and probes for fox, mink, raccoon and dog were designed and synthesized according to the conserved sequence of mitochondrial 16S rDNA. Fluorescent PCR reaction system and reaction conditions were optimized. A number of real - time fluorescent PCR methods were established. Four kinds of animal - derived components were detected in the same PCR reaction system. The developed method could successfully detect four kinds of animal derived

---

步迅 sherry6423@126.com

泰山学者工程专项经费资助

materials including fox, mink, raccoon and dog in the same reaction. Through the detection of the source components of 15 other species, the results showed that the primers and probes designed in this experiment had good species specificity. The method has high sensitivity, fox, mink, raccoon and dog DNA detection limit of 0.01ng. Of the 40 samples tested, 5 of them detected raccoon, fox and mink-derived ingredients. The results showed that the method has high specificity and sensitivity. It could effectively identify the fox, mink, raccoon and dog - derived components in the feed, and it was suitable for the related animal products.

Keywords： mitochondrial 16S rRNA; Multiple real-time fluorescent PCR; fox, mink, raccoon and dog derived materials

饲料安全隐患问题与动物生产、环境污染、和人类健康密切相关，已成为全球性关注的热点问题[1]。2014 年，据农业部统计数据，在我国北方河北、山东、山西等地，狐狸、水貂、貉子及肉狗的年饲养量大约为 10000 万只。这些动物毛皮由于其保暖性好被用作名贵衣服的原料，但这些动物的肉类去向不明，据报道这些肉被不法商贩大量低价收购，掺假到价格较高的肉里，最有可能掺入到羊肉、牛肉或驴肉中去，经加工制成肉卷、肉串、香肠等流通到市场，另外内脏骨头等下脚料可能掺入到动物饲料原料肉骨粉中。而貉子、狐狸、水貂和狗本身是杂食性动物，既吃动物性饲料也吃植物性饲料，但他们尤其喜好动物性饲料，熟制的症猪肉、用鼠夹和鼠笼扑捉的鼠肉、免肉及其下脚料、熟制的狗肉等，都是犬科动物的极好动物性饲料。狐狸、貉子、水貂作为皮毛经济动物，养殖过程中有时需要添加激素类饲料，并且要定期注射一些抗生素药品，因此体内常残留超标的激素和抗生素，故这些皮毛动物不能作为人类常用肉类供人食用。这种假冒制品由于可能含有激素抗生素超标最终进入食物链不仅危害人类健康，严重损害了消费者的利益。此外，为防止疯牛病、痒病的传播，包括我国在内的欧盟、美国等很多国家先后颁布多个法规，规定禁止在反刍动物饲料中添加以哺乳类动物为原料的动物性饲料产品，以有效防止哺乳动物的病原体从动物传染到别的动物和人类[2]。

目前，饲料中动物源性成分鉴别的主要方法有化学、色谱层析、免疫学和分子生物学方法，但每种方法都有一定的局限性[3,4]。利用常规 PCR 检测饲料中的动物源性成分是近些年常用的方法[5-7]。而与常规 PCR 相比，实时荧光 PCR 法以其操作简便、灵敏、特异、快速、重复性好、定量准确、闭管反应等优点，得到国内外研究者的普遍认可，成为检测的重要工具[8-9]。利用实时荧光 PCR 检测饲料中动物源性成分报道较多的主要集中于鸡、鸭、鹅、牛、羊、马属、猪、猫及鱼骨粉。Safdar M 等 [10]利用 SYBER Green 荧光 PCR 法可检测到牛和家禽的灵

敏度达到 0.001%。Dalmasso A 等 [11]利用多重 PCR 检测到饲料中反刍动物、家禽、鱼和猪源性成分。刘彦泓等 [12]和汪永信等 [13]均报道了利用实时荧光 PCR 检测饲料和食品中的鸡源性成分。高延玲等 [14]和魏战勇等 [15]报道了反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品中牛羊源成分检测，陈颖等 [16]利用 PCR 检测到了饲料中马属源性成分。肉骨粉中掺假较多的鱼类源性成分利用 PCR 技术也被检测 [17]。李通等 [18]利用 PCR 检测了犬科（狼、狐、豺）的源性成分。而利用多重实时荧光 PCR 同时检测狐狸、水貂、貉子和狗源性成分未见相关报道。目前对饲料和肉骨粉中动物源性的荧光定量 PCR 检测研究均缺乏阳性扩增内标（Internal Amplification Control, IAC）对反应体系进行监控，无法避免由反应抑制因素而造成假阴性结果的产生，导致检测结果不准确。当前，在国际上添加有外源扩增内标的饲料和肉骨粉中动物源性多重荧光定量 PCR 检测方法还是空白。因此，建立有外源扩增内标并针对饲料或肉骨粉中狐狸、水貂、貉子和狗源性成分的多重荧光定量 PCR 检测方法，对饲料安全和食品安全的快速监管具有重要的创新实践意义。

本试验应用实时荧光定量 PCR 技术及核酸 DNA 分子标记技术，采用多重多色荧光 PCR 检测体系，根据线粒体 16S rRNA 基因高度保守区域设计通用引物，根据可变区序列设计狐狸、水貂、貉子和狗 4 种动物源性的特异性探针；建立并完善多重实时荧光 PCR 体系和扩增条件，实现一管 PCR 反应可同时检测狐狸、水貂、貉子和狗 4 种动物源性成分的定性检测。

1 材料与方法

1.1 供试材料

狐狸肉、水貂肉、貉子肉均来自于山东某养殖场，狗肉、生牛肉、生绵羊肉、生猪肉、生山羊肉、生兔肉、生鸭肉、生鸡肉、生鹅肉、生鱼肉、玉米、小麦等购于济南市农贸市场。

饲料肉骨粉：鸡肉粉 10 份，猪肉粉 15 份，猪水解蛋白粉 5 份，鸭粉 6 份，进口鸡肉粉 4 份等均来自于某些生产厂家。

1.2 试剂与仪器

动物组织提取试剂盒为 OMEGA 品牌。TaqTM Hot Star Version 热启动酶、dNTPs 等 PCR 反应试剂购自宝生物工程（大连）有限公司。引物与探针由生工

生物工程（上海）有限公司负责合成。2×TaqMan Master Mix 为 DBI Bioscience 品牌。 DNA 测序由山东省农业科学院生物技术研究中心测序中心完成。

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司产品，Takara PCR 仪为宝生物工程（大连）有限公司产品，5424 D 型高速离心机为 Eppendorf 公司产品，凝胶成像仪为 BIO-RAD 公司产品。

1. 3 方法

1.3.1 引物与探针的设计

从 NCBI 数据库中分别下载狐狸、水貂、貉子和狗的线粒体 16S rRNA 基因序列，应用同源分析工具 Mega5.0 软件进行同源性比对，利用引物设计软件 Primer 5.0 根据筛选出的核心片段两端相似序列设计一对通用引物，使用 Primer3.0 设计 TaqMan 特异探针，在 NCBI 数据库中 BLAST 探针和引物的特异性，分别采用 5 种不同发光基团如 FAM，JOE，CY3，CY5，ROX 对各个探针的 5’端进行荧光素修饰，3’端的淬灭基团用 TAMRA 或 BHQ1 或 BHQ2 修饰。

表 1 狐狸、水貂、貉子和狗源性成分的引物与探针序列

Table1 Primer and Proble Sequence of Fox, Mink, Racoon and Dog

引物名称 Primer name	引物与探针序列 Primer and Proble Sequence	扩增长度 size (bp)
线粒体16S rRNA基因通用引物 Universal primers of mitochondrial 16S rRNA	上游引物：MtUF: 5' CTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATAC 3' 下游引物：MtUR: 5' TCCGAGGTCACCCCAACCTAAA 3'	152
貉子特异探针(NYP) Specific probe of raccoon	5’ JOE-CTTTAATTACTTAACCCAAATTTATGGCCAA-BHQ2 3’	
水貂特异探针(SD-P) Specific probe of mink	5’ CY3-CCCATAATAATTTATAAACTCACCTACCAGGTCTAA-BHQ2 3’	
狐狸特异探针(H-P) Specific probe of fox	5’ FAM-TTAGCCCAAACCCATGAAATCCAAACCCCT-BHQ1 3’	

狗特异探针(CLF) Specific probe of dog	5’ ROX-CTAACCCAAACTTATGGATACTAGATACCTACA-BHQ2 3’
内标探针(IMP) Internal standard probe	5'CY5-AAGTACGCTCCATTGGTGACCTCA-BHQ2 3'
内标序列 Internal standard sequence	CTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATACAGCACGCCGTAAGCTTAACCT 107 GACGCTAGTAGGCAAGTACGCTCCATTGGTGACCTCATTTTTTAGG TTGGGGTGACCTCGGA

1.3.2 阳性扩增内标 DNA 重组质粒的构建

使用随机序列 DNA 生成工具 DNAux3.0 产生一段 DNA 序列[19]，在 NCBI 中 BLAST 无与之同源的 DNA 片段，在这段随机 DNA 序列上下游分别连接上 4 种犬科动物源性的通用扩增引物序列（上游为原序列，下游为反向互补序列），从而形成 107 bp 的阳性扩增内标 DNA 序列，将这段扩增内标序列委托人工基因合成，合成片段连接到 PMD18-T 载体上，转化感受态 DH5-a，质粒提取，利用 ABI3730XL 测序仪对重组质粒进行测序验证，结果与目的片段一致。

1.3.3 样品 DNA 的提取

待测样本 50 g 研磨充分混匀，取 50 mg 进行 DNA 提取，可用动物组织提取试剂盒提取 DNA，也可用经典手提法（参照分子克隆手册动物组织 DNA 提取方法）。Nanodrop 核酸检测仪检测提取 DNA 浓度和纯度，要求浓度在 1~20 ng/μL，OD 值 1.7-1.8 之间。

1.3.4 目的基因的扩增及标准品的构建

以狐狸、水貂、貉子和狗为模板使用 MtUF/ MtUR 引物对进行 PCR 扩增，条件 95℃3 min；95℃30 S，58℃30 S，72℃45 S，35 个循环；将 4 种动物源性 PCR 产物分别切胶回收后，连接到 PMD18-T Vector，将连接子转化到 DH5α 感受态细胞中，涂板过夜培养，挑取单克隆，PCR 酶切验证阳性克隆子，对克隆子测序进一步确认目的基因狐狸、水貂、貉子和狗源性成分。

1.3.5 多重荧光 PCR 检测方法的建立

单重荧光 PCR 检测方法的建立：通过对单一荧光定量 PCR 反应体系中的 dNTPs、Taq 酶用量、引物浓度、探针浓度和退火温度的优化，建立了狐狸、水

貂、貉子和狗的单重荧光定量 PCR 方法。其中上下游引物以 1.0、2.0、5.0、10.0 μmol/L 为浓度梯度，探针浓度在 1.0 μmol/L~5.0 μmol/L 之间，以 1.0 μmol/L 梯度递增，每个浓度梯度做 5 个平行样，使用 ABI7500 定量 PCR 仪器，PCR 反应条件：95℃30 S 预变性；95℃10 S，58℃ 34 S（收集荧光信号），40 个循环。对所得的每个浓度梯度的循环阈值（Cycle threshold，Ct）进行比较，每次试验采用等量模板，每个反应条件重复试验 3 次，以产生 Ct 值最小、荧光信号强度最高和 Ct 值标准偏差最小综合指数最高为依据对引物浓度进行优化选择。在体系中引物和探针浓度优化后将退火温度设置为 56-64℃以 2℃为一个梯度，共 5 个退火温度进行实时荧光定量 PCR 扩增，同一模板 5 个平行样的 3 次重复试验，对扩增所得数据进行分析，除了以产生 Ct 值最小、荧光信号强度最高和 Ct 值标准偏差最小综合指数最高为依据外，还要考虑既保证扩增效率的同时又要确保探针的特异性等条件，最终确立最佳的退火温度。

多重实时荧光 PCR 检测方法的建立：在单一荧光 PCR 建立的最优体系和确保试验特异性及稳定性的基础上，在同一反应体系中加入狐狸、水貂、貉子和狗 4 种犬科动物的通用引物和特异探针以及阳性内标探针及内标质粒 DNA，并根据阈值（即 Ct 值）和荧光增量，对各引物、探针浓度及循环参数进行优化，确定多重实时荧光 PCR 检测体系和方法。

1.3.6 多重实时荧光 PCR 特异性试验

分别从狐狸肉、水貂肉、貉子肉、狗肉、生牛肉、生绵羊肉、生山羊肉、骆驼肉、生猪肉、生兔肉、生鸭肉、生鸡肉、生鹅肉、生鱼肉、玉米、小麦中提取基因组 DNA 为模板，按照上述优化的反应体系和反应条件进行荧光定量 PCR，检测引物和探针的特异性。

1.3.7 多重实时荧光 PCR 灵敏度试验

使用动物组织提取试剂盒提取狐狸肉、水貂肉、貉子肉和狗肉基因组 DNA，用紫外分光光度计定量到 10 ng/μL，按照 10 倍梯度逐级稀释（10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}，10^{-4}），每个梯度均取 2.0 μL 为模板量，按照 1.3.6 优化后的多重 PCR 反应体系和反应条件通过分别检测狐狸、水貂、貉子和狗的不同 DNA 浓度的模板以评价方法的灵敏度。将每组检测设立 3 个平行样，每个样品重复 3 次，每次试验的结果一致才能确定该方法的检测限灵敏度，通过 5 次试验，分析同一个样本的方差

来评价多重荧光定量 PCR 方法的再现性及重复性。

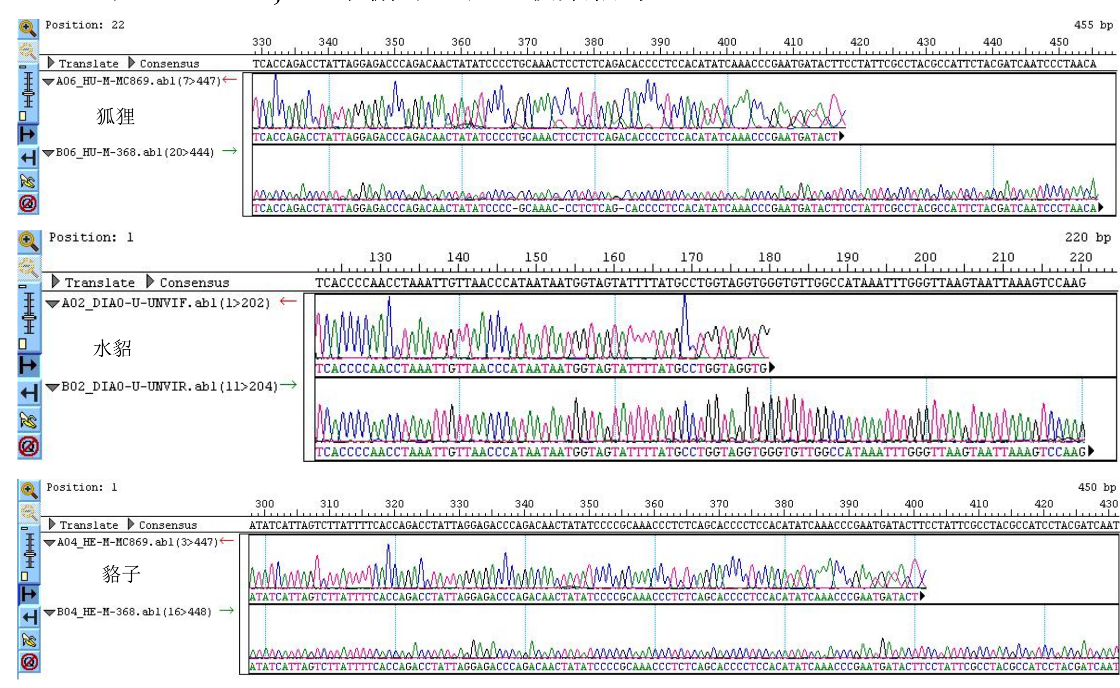
1.3.8 样品检测

利用建立的多重实时荧光 PCR 检测方法对市售鸡肉粉 10 份，猪肉粉 12 份，猪水解蛋白粉 5 份，鸭粉 6 份，鱼粉 3 份，进口鸡肉粉 4 份，不同厂家共 40 份样本，进行貉子、狐狸、水貂和狗 4 种源性成分，以验证方法的使用价值。

2 结果

2.1 通用引物单一动物 PCR 扩增结果及单重荧光 PCR 检测方法的建立

使用一对通用引物 MtUF/R 分别扩增狐狸、水貂、貉子和狗的基因组 DNA，引物的退火温度在 58℃；其扩增目的片段大小均为 152bp， DNA 测序结果表明，荧光 PCR 阳性扩增产物的序列分别和预期序列一致（图 1）， 分别确定狐狸、水貂、貉子和狗的源性成分。以狐狸、水貂、貉子和狗为研究对象，反应体系设定为 20 μL，2×TaqmanMaster mix 10.0 μL，对 dNTPs、Taq 酶用量、引物浓度、探针浓度和退火温度的优化。确定最佳引物浓度为 5.0 μmol/L，图 2A-D。狐狸、水貂、貉子、狗和内标质控探针的终浓度分别为 5.0 μmol/L，5.0 μmol/L，0.2 μmol/L，0.1 μmol/L 和 1.0 μmol/L。PCR 反应最佳反应条件为：95℃ 3 min；{95℃ 10 s；60℃ 35 S} 40 个循环，在此收集信号。



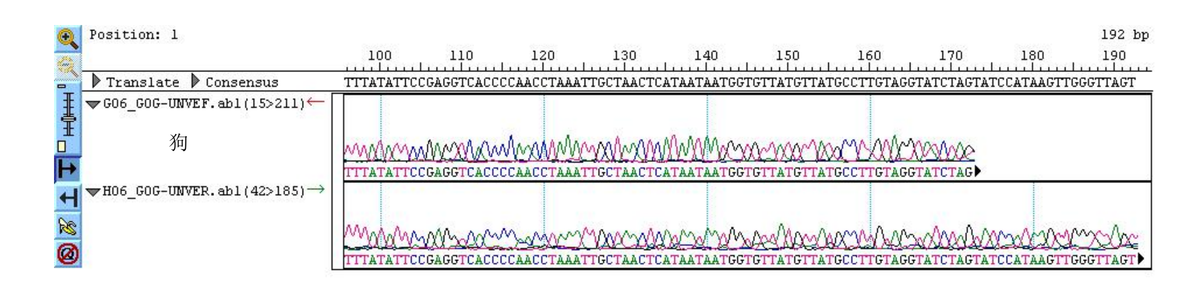


图 1 狐狸、水貂、貉子和狗测序结果图

Fig1. Sequence results of fox, mink, raccoon and dog

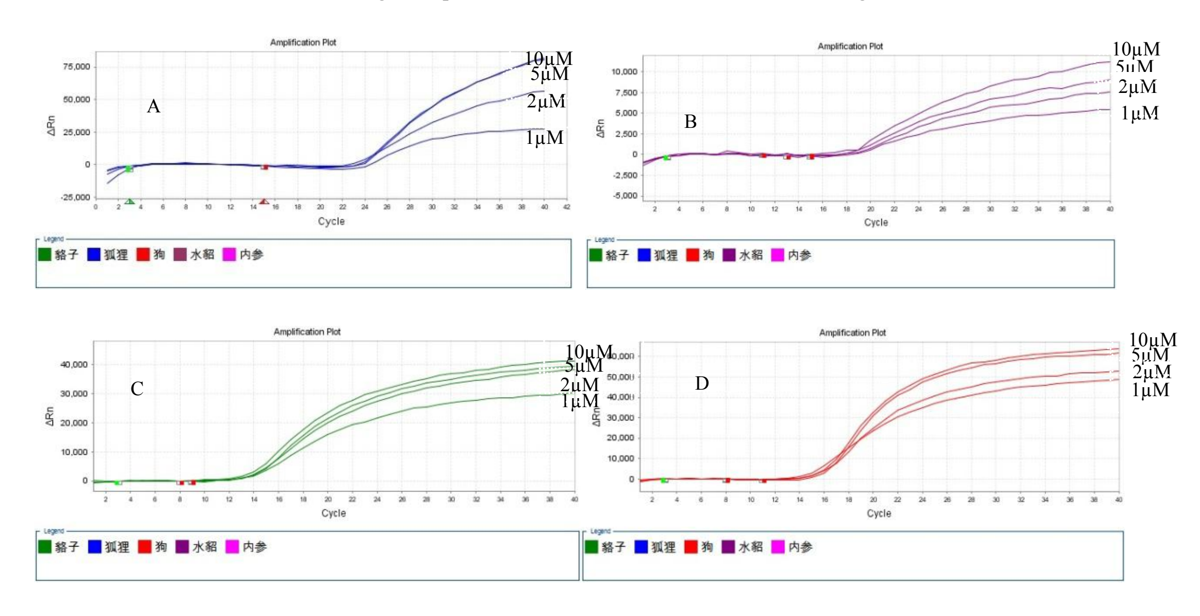


图 2 狐狸、水貂、貉子和狗引物浓度优化实验

Fig2. Primer concentration detection of fox, mink, raccoon and dog

2.2 多重荧光 PCR 检测方法的建立

通过对 4 种动物源性引物浓度的优化试验发现随着探针用量的增加，荧光阈值信号逐渐增强，但引物浓度达到一定程度后信号基本不再改变，如图 2A-D，因此确定最佳引物浓度为 5 μ mol/L。通过探针浓度梯度优化，总反应体系为 20 μ L，包括 2×TaqmanMaster mix 10.0 μ L，Primer Mix（2 μmol/L）2.0 μ L，Probe Mix（2 μmol/L）2.0 μ L，IAC DNA（1.0 pg/ μ L）1.0 μ L，DNA Template（1-20 ng/ μ L）2.0 μ L，ddH_2O 3 μ L, PCR 体系见表 2。反应条件为：95℃10 min；45 个循环，95℃10s，58℃ 35s，在此收集荧光信号。待测样本检测结果判定：在同时进行的空白、阳性对照实验结果正常的情况下，被检测样品应有相应荧光信号检出，且相应荧光通道出现明显的扩增曲线，Ct 值<35，说明 DNA 提取是有效的。

表 2 狐狸、水貂、貉子和狗多重实时荧光 PCR 体系

Table 2 fox, mink, raccoon and dog multiple real-time PCR system

试剂名称	组分名称	加量（μL）	终浓度
2×TaqManMaster Mix		10	1×
10× Primer Mix	MtUF F/ MtUF R	2	0. 50 μM
10× Probe Mix	水貂 SD-P(CY3)	2	0.25 μM
	狐狸 H-P(FAM)		0.025μM
	貉子 NYP-(JOE)		0.025 μM
	狗 CLF(ROX)		0.10μM
	内标(CY5)		0.025 μM
内标质粒		1	1pg/μL
DNA 模板		2	1~50ng/μL
ddH_2O		3	

2.3 多重荧光 PCR 特异性试验

按照 1.3.8 的方法针对狐狸、水貂、貉子和狗的引物和探针进行特异性检测，当只有 FAM 荧光检出时，且 Ct 值<35，不管 CY5 荧光信号内标质控是否被检出（如果检测样品的浓度高会抑制 Internal Control DNA 的扩增），则可视为含狐狸成分（图 3A）；当只有 CY3 荧光被检出时，且 Ct 值<35，不管 CY5 荧光信号内标质控是否被检出，则可视为含水貂源成分（图 3B）；当只有 JOE 荧光被检出时，且 Ct 值<35，不管 CY5 荧光信号内标质控是否被检出，则可视为含貉子成分（见图 3C）；当只有 ROX 荧光被检出时，且 Ct 值<35，不管 CY5 荧光信号内标质控是否被检出,则可视为含狗源成分（图 3D）；当只有 CY5 荧光被检出时，且 Ct 值<35，未检出狐狸、水貂、貉子和狗的源性成分则为阴性（图 3E）。另外，通过表 3 可以看出，狐狸、水貂、貉子和狗均有 Ct 值，而其他样

本没有扩增。综上表明，狐狸、貉子、水貂和狗的引物和探针具有很好的物种特异性。

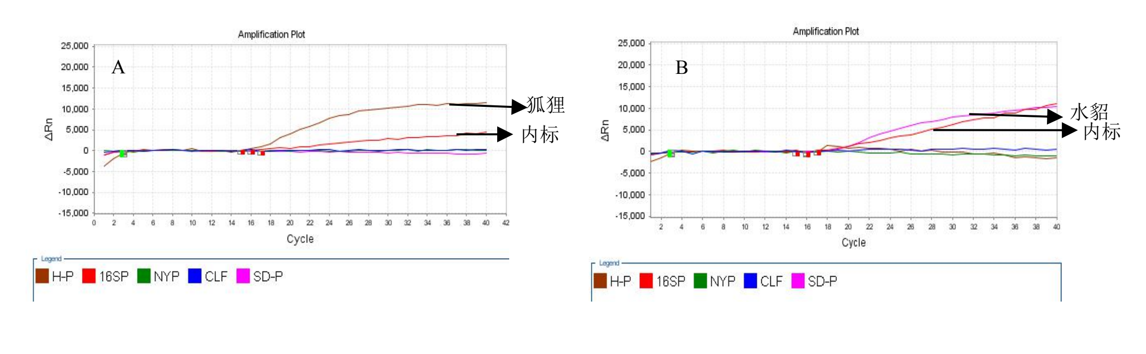
表 3 狐狸、水貂、貉子和狗的引物及探针特异性试验

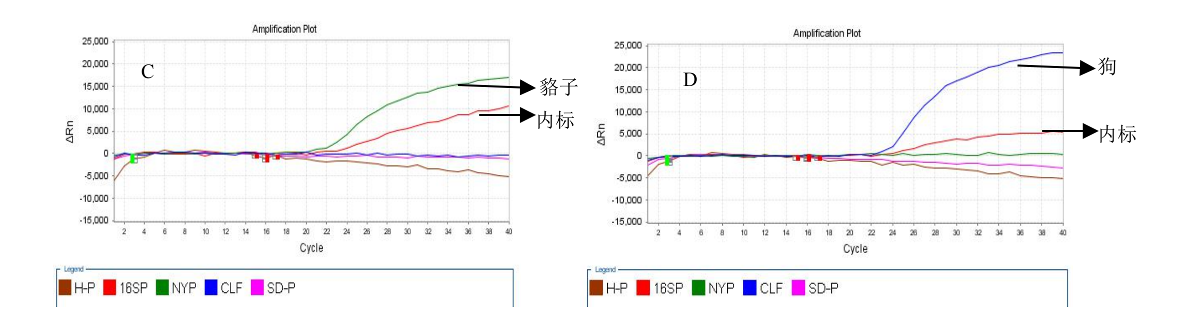
Table 3 Primer and Proble specificity detection of fox, mink, raccoon and dog

物种 Species	荧光定量 PCR 检测 Ct 值 Ct value of real-time PCR				
	狐狸（FAM） Fox(FAM)	貉子（JOE） Raccoon(JOE)	水貂（CY3） Mink(CY3)	狗（ROX） Dog(ROX)	内标（CY5） Internal standard(CY5)
貉子 Raccoon	N	24.62±0.05	N	N	31.26±0.02
狐狸 Fox	28.35±0.02	N	N	N	30.59±0.05
水貂 Mink	N	N	28.21±0.04	N	29.56±0.05
狗 Dog	N	N	N	27.59±0.04	29.42±0.04
牛 Bovine	N	N	N	N	27.60±0.02
绵羊 Sheep	N	N	N	N	28.89±0.04
山羊 Goat	N	N	N	N	27.21±0.04
猪 Pig	N	N	N	N	26.32±0.04
兔 Rabbit	N	N	N	N	27.49±0.04
鸭 Duck	N	N	N	N	23.14±0.04
鸡	N	N	N	N	27.28±0.04

Chicken					
鹅 Goose	N	N	N	N	24.21±0.04
鱼 Fish	N	N	N	N	26.96±0.04
玉米 Corn	N	N	N	N	26.53±0.04
小麦 Wheat	N	N	N	N	25.32±0.04


（注：**N** 代表 Negative，阴性。）





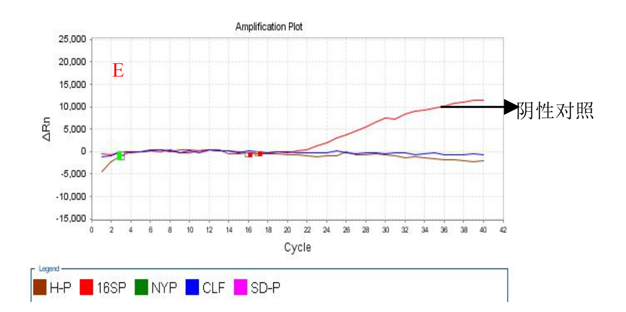


图 3 狐狸、水貂、貉子、狗和阴性对照特异性扩增曲线图

Fig3. Specific amplification curver of fox, mink, raccoon ,dog and negative control

2.4 多重荧光 PCR 灵敏度试验

按照 1.3.9 上述方法分别对狐狸、水貂、貉子、和狗 DNA 检测以考察引物和探针的灵敏度。分析结果显示：当模板量为 0.01 ng 时，有扩增曲线且 Ct 值<35，当模板量为 0.001 ng 时，有扩增曲线但 Ct 值＞35，貉子、狐狸、水貂和狗的检出限均为 0.01ng（图 4A-D）。

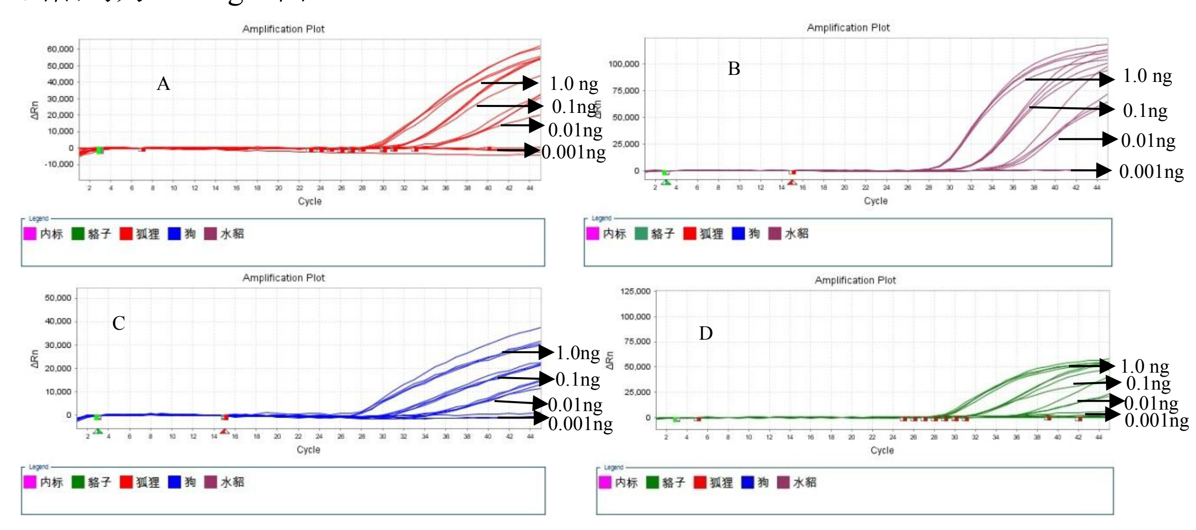


图 4 狐狸、水貂、貉子和狗灵敏度扩增曲线图

Fig4. The sensitivity detection of fox, mink, raccoon and dog

2.5 样品检测

对市售鸡肉粉 10 份，猪肉粉 12 份，猪水解蛋白粉 5 份，鸭粉 6 份，鱼粉 3 份，进口鸡肉粉 4 份，不同厂家共 40 份样本，采用本试验所述检测方法检测貉子、狐狸、水貂和狗 4 种源性成分，以验证方法的使用价值。由表 3 可见，对市场上采购的 40 份样品检测，其中 5 份检测出貉子、狐狸和水貂源性成分。表明，此方法具有一定的使用价值。

表 3 市售肉制品中狐狸、貉子、水貂和狗源性成分检测

Table3 Test results of fox, mink, raccoon and dog derived materials in the commercial meat products

样品名称 Samples name	荧光定量 PCR 检测 Ct 值 Ct valus of real-time PCR					结果显示 Results
	狐狸（FAM） Fox(FAM)	貉子（JOE） Raccoon(JOE)	水貂（CY3） Mink(CY3)	狗（ROX） Dog(ROX)	内标（CY5） Internal standard(CY5)	
鸡肉粉 1 Chicken powder 1	N	26.23±0.05	N	N	30.26±0.02	检出貉源性成分
鸡肉粉 2	N	N	N	N	28.59±0.05	未检出

Chicken powder 2						
鸡肉粉 3 Chicken powder 3	26.23±0.05	N	29.21±0.04	N	29.56±0.02	检出狐狸和水貂源性成分
鸡肉粉 4 Chicken powder 4	N	N	N	N	29.42±0.05	未检出
鸡肉粉 5 Chicken powder 5	N	N	N	N	27.60±0.03	未检出
猪肉粉 1 Pig powder	27.89	N	N	N	28.89±0.04	检出狐狸源性成分
猪水解蛋白粉 1 Pig-hydrolyzed protein powder	N	N	N	N	27.21±0.04	未检出
鸭粉 Duck powder	25.47	N	N	N	26.32±0.04	检出狐狸源性成分
鸭粉 2 Spiced-bovine Meat	N	N	N	N	27.49±0.04	未检出
鸭粉 3 Spiced-donkey Meat	N	N	N	N	23.14±0.04	未检出
鱼粉 1 Sliced mutton 1	N	N	N	N	27.28±0.04	未检出
鱼粉 2 Sliced mutton 2	N	N	N	N	24.21±0.04	未检出
鱼粉 3 Sliced mutton 3	29.32	N	N	N	26.96±0.04	检出狐狸源性成分
猪水解蛋白粉 2 Pig-hydrolyzed	N	N	N	N	28.53±0.04	未检出

protein powder						
猪肉粉 2 Pig powder2	N	N	N	N	29.32±0.04	未检出
猪肉粉 3 Pig powder3	N	N	N	N	27.53±0.04	未检出
猪肉粉 4 Pig powder4	N	N	N	N	25.32±0.04	未检出
猪肉粉 5 Pig powder5	N	N	N	N	25.83±0.04	未检出
猪肉粉 6 Pig powder6	N	N	N	N	30.32±0.04	未检出
猪肉粉 7 Pig powder7	N	N	N	N	29.49±0.04	未检出
猪肉粉 8 Pig powder8	N	N	N	N	27.62±0.04	未检出

3 讨论

近年来，受饲料原料和饲料添加剂污染的食品曝光事件不断，饲料及肉骨粉的安全问题也成为大家普遍关注的问题，这不仅关系到畜牧行业的健康稳定发展，而且会间接危害到人类的身体健康。饲料安全性从根本上说是动物源性成分的安全性。目前对于饲料及其肉骨粉中动物源性成分的鉴定主要是以显微镜为基础进行鉴定、以蛋白质为基础进行鉴定、利用高效液相色谱技术鉴定、应用近红外光谱技术进行鉴别及以 DNA 为基础进行的鉴定。但是这些方法都有其自身的局限性，而且对于检测者的经验和样品的品质都有一定的要求。随着分子生物学的不断发展，利用实时荧光 PCR 检测技术对于动物源性成分的检测日益的广泛。本研究建立的 5 重多色荧光定量 PCR 反应能在同一管中同时检测狐狸、水貂、貉子和狗 4 种动物的源性成分，无需开盖，不易污染等特点。通过荧光信号强度和阈值判读的结果直观、准确，一次可进行 96 个样品的检测，具有准确稳定、操作简单，灵敏度极高，特异性强，通量大等优势，同时能降低工作量，为饲料和食品中动物源性成分鉴定探索了新的途径。

对于动物源性成分荧光 PCR 检测主要的是相关靶基因的正确选择。本试验基于线粒体基因组 DNA，作为目标靶基因，设计水貂、貉子、狐狸和狗的特异探针，具有灵敏度高、精确度好、快速、降解小（加工过程中 mtDNA 保持较完整）、稳定容易操作等优势；同时本研究通过设计人工合成一段外源性内标质粒 DNA，在体系中加入特异性探针并与靶基因共用一对引物，能有效指示假阳性出现，同时降低了多对引物对于荧光 PCR 体系产生干扰的风险。

利用建立的检测方法对抽样的 40 份市售饲料原料肉骨粉，进行狐狸、水貂、貉子和狗 4 种动物源性成分检测，发现其中 5 份检测出貉子、狐狸和水貂源性成分，表明市场上饲料和食品中掺假现象仍然存在，同时饲料安全监管仍然存在漏洞。本研究所建立的检测方法可以快速、准确的检测出狐狸、水貂、貉子和狗的源性成分，能够为质量监管部门提供准确可靠的技术支持，并且可作为有效防止生产商家掺假检测的有效手段。

参考文献：

[1] 王丽. 饲料中动物源性成分 PCR 检测方法的建立和应用[D]. 扬州大学, 2007.
Wang L.Preparation and application of PCR detection method for animal-derived components in feed [D]. Yangzhou University, 2007.

[2] 于炎湖. 动物源性饲料产品的安全卫生及其监督管理的有关问题[J]. 饲料工业, 2005, 26(4):1-5.
Yu YH. Safety and Health of Animal - derived Feed Products and Its Supervision and Management [J]. Feed Industry, 2005, 26 (4): 1-5.

[3] Muller A, Steinhart H. Recent developments in instrumental analysis for food quality[J]. Food Chemistry, 2007, 101(3):436–444.

[4] Haza A I, Morales P, Martín R, et al. Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1999, 79(7):1043–1047.

[5] Federica B,Vittorio MM, Sergio C, Franco V. Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction−Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA[J].J. Agric. Food Chem., 2001, 49 (8): 3775~3781.

[6] Martín I, García T, Fajardo V, et al. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs[J]. Meat Science, 2007, 75(1):120-7.

[7] Ghovvati S, Nassiri M R, Mirhoseini S Z, et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay[J]. Food Control, 2009, 20(8):696-699.

[8] Pegels N, González I, Martín I, et al. Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs[J]. Food Control, 2011, 22(8):1189-1196.

[9] Rodriguez M A, Garcia T, Gonzalez I, et al. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures.[J]. Meat Science, 2005, 70(1):113-20.

[10] Safdar M, Junejo Y. Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on SYBER Green florescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs[J]. Food Chemistry, 2015, 173:660-664.

[11] Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs[J]. Molecular & Cellular Probes, 2004, 18(2):81-87.

[12] 刘彦泓，穆春，孙屏,等. 实时荧光 PCR 和常规 PCR 方法检测饲料中鸡源性成分[J]. 饲料工业, 2010, 31(7):45-47.

Liu YH, Mu C,Sun P, et al. Real-time PCR and routine PCR for the determination of chicken-derived components in feed [J]. Feed Industry, 2010, 31 (7): 45-47.

[13] 汪永信，安虹，程坚,等. 双重实时荧光 PCR 法检测食品和饲料中的鸡源性成分[J]. 生物技术通报, 2012(1):134-138.

Wang YX, An H, Cheng J, et al. Detection of Chicken Source Components in Food and Feed by Dual Real-time Fluorescence PCR [J]. Biotechnology Bulletin, 2012 (1): 134-138.

[14] 高延玲，狄元冉，董鹏,等. 反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品中牛羊源成分检测[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 33(7-8):29-31.

Gao YL, Di YR, Dong P, et al. Detection of composition of cattle and sheep in ruminant feed products and animal-derived feed products [J]. Journal of Animal Science and Animal Science, 2014, 33 (7-8): 29-31.

[15] 魏战勇，王学斌，张红英,等. 反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品中牛羊源成分检测[J]. 中国农学通报, 2009, 25(6):25-28.

Wei ZY, Wang XB, Zhang HY, et al. Ruminant feed products and animal origin feed products in cattle and sheep source composition detection[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25 (6): 25-28.

[16] 陈颖，吴亚君，徐宝梁,等. 食品及饲料中马属动物源性成分的 PCR 检测研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(5):78-83.

Chen Y, Wu YJ, Xu BL, et al.Study on PCR detection of animal origin components in food and feed [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 24 (5): 78-83.

[17] 贺云霞，王加启，王丽,等. 应用 PCR 技术检测饲料中的鱼源性成分[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6):953-957.

He YX, Wang JQ, Wang L, et al. Application of PCR technology to detect fish-derived components in feed [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15 (6): 953-957.

[18] 李通，尹艳，袁其朋,等. 运用 PCR 方法鉴别四种犬科动物的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17):146-149.

Li T, Yin Y, Yuan QP, et al. Study on the Identification of Four Canines by PCR Method [J]. Food Industry Technology, 2013, 34 (17): 146-149.

[19]何晓华，史贤明. 扩增内标及其在食源性致病菌 PCR 检测中的应用[J]. 微生物学报, 2010, 50(2):141-147.

He XH, Shi XiM, .Application of Expanded Internal Standard and Its Application in PCR Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria [J] .Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50 (2): 141-147.